

Caracterização de endófitos da videira pertencentes ao complexo *Epicoccum nigrum* e sua interação com fungos do lenho da videira

Characterization of endophytes of grapevine belonging to *Epicoccum nigrum* complex and its interaction with grapevine trunk fungi

Tatiana Santos Coletto, Teresa Nascimento, Ana Cabral e Helena Oliveira*

LEAF-Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(*E-mail: heloliveira@isa.ulisboa.pt)

<https://doi.org/10.19084/RCA.17069>

Recebido/received: 2018.01.20

Aceite/accepted: 2018.12.23

RESUMO

Endófitos do género *Epicoccum* são frequentemente isolados do lenho da videira, associados ou não a fungos patogénicos, designadamente a *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeomoniella (Pa.) chlamydospora*, *Phaeoacremonium (Pm.) minimum* (sin. *Pm. aleophilum*), bem como a fungos “*Botryosphaeriaceae*”, mas desconhece-se o seu efeito em relação aos fungos que coabitam com esses endófitos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade de uma coleção de endófitos, do género *Epicoccum* (Epic), obtida a partir do lenho da videira e contribuir para a melhor compreensão das interações que estabelecem *in vitro* com fungos patogénicos do lenho da videira. Com base em características culturais e na sequenciação de parte do gene da β -tubulina (TUB2), os isolados foram agrupados em quatro grupos dentro do complexo *E. nigrum*, que revelou ser um complexo de espécies crípticas. Para avaliação das interações Epic *versus* fungos do lenho da videira, a coleção foi previamente testada contra um fungo “*Botryosphaeriaceae*”, tendo o isolado Epic 2 surgido no grupo dos que revelaram atividade antagonista significativamente mais elevada ($\alpha = 0,05$). Epic 2 inibiu também significativamente o crescimento micelial dos fungos do complexo da esca, *Pa. chlamydospora* (45,8%), *F. mediterranea* (42,7%) e *Pm. minimum* (18,8%). Discutem-se os mecanismos de interação entre endófitos e fungos patogénicos do lenho da videira, bem como o potencial apresentado por Epic 2 como antagonista.

Palavras-chave: antagonismo, controlo biológico, fungos do lenho da videira, *Vitis vinifera*.

ABSTRACT

Endophytes of the *Epicoccum* genus are often isolated from the grapevine wood associated or not with pathogenic fungi such as *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeomoniella (Pa.) chlamydospora*, *Phaeoacremonium (Pm.) minimum* (sin. *Pm. aleophilum*) and “*Botryosphaeriaceae*”. However, the effect of those endophytes on cohabiting grapevine wood fungi is unknown. The present study aimed to evaluate the variability of a collection of endophytes, of *Epicoccum* (Epic) genus, obtained from the grapevine wood and to contribute to a better understanding of the interactions that it establishes with pathogenic fungi of grapevine, *in vitro*. Based on cultural characteristics and sequencing of part of the β -tubulin gene (TUB2), the isolates were grouped into four clusters within the *E. nigrum* complex, which proved to be a complex of cryptic species. To evaluate the interactions between Epic and the grapevine trunk fungi, the collection was first screened against a “*Botryosphaeriaceae*” fungus, the Epic 2 isolate appearing among those that showed significantly higher antagonistic activity ($\alpha = 0.05$). Epic 2 also inhibited significantly the mycelial growth of fungi from the esca complex, *Pa. chlamydospora* (45.8%), *F. mediterranea* (42.7%) and *Pm. minimum* (18.8%). The mechanisms of interaction between endophytes and pathogenic grapevine trunk fungi are discussed, as well as the potential presented by Epic 2 as an antagonist.

Keywords: antagonism, biological control, grapevine trunk fungi, *Vitis vinifera*.

INTRODUÇÃO

Todas as plantas no seu habitat natural encontram-se geralmente associadas a microrganismos endófitos, essencialmente bactérias e fungos (Pancher *et al.*, 2012), os quais são considerados onnipresentes no reino Plantae. Atualmente, o termo endófito é utilizado para descrever microrganismos que podem também colonizar raízes e rebentos, causando infeções assintomáticas e que durante o seu ciclo de vida podem deixar de vir a exercer o papel de endófito (Porras-Alfaro e Bayman, 2011) e passar a atuar como agentes patogénicos durante o processo de senescência do hospedeiro (Aly *et al.*, 2011). Os endófitos terão coevoluído com as plantas (Kusari *et al.*, 2012), estabelecendo diferentes tipos de interações com o hospedeiro, desde mutualismo, comensalismo, a patogenicidade latente, saprofitismo latente e estados iniciais de colonização (Shulz e Boyle, 2006; Porras-Alfaro e Bayman, 2011). Essas interações apresentam uma elevada plasticidade fenotípica, em função do genótipo, estágio de desenvolvimento e estado nutricional do hospedeiro e de fatores ambientais (Shulz e Boyle, 2006).

Todas as espécies de plantas possuem uma comunidade endofítica que difere entre si, podendo haver espécies/isolados dominantes para o mesmo hospedeiro. Por sua vez, a composição da comunidade endofítica pode diferir significativamente para cada tipo de célula, tecido ou órgão da planta (Arnold, 2005; Schulz e Boyle, 2006; Aly *et al.*, 2011; Porras-Alfaro e Bayman, 2011).

A entrada dos endófitos nos tecidos vegetais dá-se principalmente através de feridas e raízes secundárias laterais emergentes, podendo também penetrar via estomas, lenticulas e hidátodos. Contudo, os fungos endófitos são capazes de produzir enzimas necessárias para penetrar e colonizar as plantas hospedeiras (Chandra, 2012; Rajesh e Rai, 2013), permitindo que estes vivam simbioticamente com a planta, e induzam mecanismos de defesa da planta hospedeira contra agentes patogénicos (Rajesh e Rai, 2013).

Uma vez no interior do hospedeiro, os endófitos entram em estado de latência e assim podem permanecer por um longo período ou por quase todo o tempo de vida do hospedeiro, dependendo das condições ambientais existentes (Aly *et al.*,

2011). O equilíbrio planta-endófito pode ser alterado por fatores bióticos e abióticos, que ativam fatores de virulência dos fungos levando à patogenicidade, caso a defesa da planta diminua ou a virulência do fungo aumente (Schulz e Boyle, 2006; Chandra, 2012; Kusari *et al.*, 2012). Alguns endófitos não patogénicos terão tido origem a partir de agentes patogénicos, bem como agentes patogénicos poderão ter evoluído a partir de endófitos (Porras-Alfaro e Bayman, 2011).

A videira alberga no seu interior uma grande diversidade de fungos endófitos (Casieri *et al.*, 2009; Pancher *et al.*, 2012). Estes podem desempenhar um papel importante no equilíbrio da comunidade fúngica na videira, como patogénios latentes ou endófitos de proteção, sendo que alguns podem ser usados como agentes de controlo biológico (BCA).

Epicoccum nigrum Link é uma espécie onnipresente, distribuída em vários países dos continentes europeu, asiático e americano. Este fungo coloniza diferentes tipos de solos e inúmeras espécies de plantas com valor agronómico e medicinal (Amrani *et al.*, 2014), apresentando vida saprofítica, patogénica ou endofítica. É isolado frequentemente a partir da videira, isoladamente ou em combinação com fungos patogénicos, designadamente com agentes causais das doenças do lenho da videira, *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeo-*moniella* (Pa.) chlamydospora*, *Phaeoacremonium (Pm.) minimum*, espécies de Botryosphaeriaceae, entre outros (Halleen *et al.*, 2003; Bruez *et al.*, 2014; Carlucci *et al.*, 2015), não se sabendo exatamente o papel que *E. nigrum* desempenha na videira (Kuntzmann *et al.*, 2010). Ainda assim, *E. nigrum* é conhecido por sintetizar vários compostos antimicrobianos, tais como epicorazinas A-B, epicoccinas A-D, epicoccarinas A-B, epirodinas A-B, flavipina, epipiridonas (Larena *et al.*, 2005; Fávaro *et al.*, 2012; Amrani *et al.*, 2014), e demonstrar atividade antagonista em relação a diversos fungos e oomicetas fitopatogénicos, noutros hospedeiros, nomeadamente em relação a *Ceratocystis paradoxa*, *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium verticillioides*, *Monilinia laxa*, *Phytophthora* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum* (Larena *et al.*, 2005; Fávaro *et al.*, 2012).

Também os fungos mais frequentemente envolvidos na síndrome vascular do complexo da “esca” da videira, na Europa *Pm. minimum* e *Pa.*

chlamydospora, podem viver assintomaticamente parte do seu ciclo de vida na planta mas, em algum momento, modificam o seu comportamento e tornam-se patogénicos (Mugnai *et al.*, 1999; Graniti *et al.*, 2000; Edwards e Pascoe, 2004; Slippers e Wingfield, 2007; Casieri *et al.*, 2009; Hofstetter *et al.*, 2012; Block *et al.*, 2013; Ammad *et al.*, 2014). No entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos que desencadeiam a transição do modo de vida endofítico para o patogénico. Para Hofstetter *et al.* (2012), os fungos associados à “esca” não serão agentes patogénicos verdadeiros, mas provavelmente endófitos verdadeiros ou saprófitas latentes, ou saprófitas não-específicos que fazem parte de uma comunidade especializada na decomposição de madeira senescente ou matéria lenhosa morta.

Em Portugal, o isolamento de fungos do género *Epicoccum* associados ao lenho da videira é muito frequente, seja a partir de plantas doentes seja de plantas aparentemente sãs. Os isolados obtidos revelam elevada variabilidade morfológica e cultural, sendo difícil o respetivo enquadramento específico. Por outro lado, desconhece-se que papel desempenham na comunidade fúngica que habita a videira (micobioma). Assim, foram objetivos do presente trabalho (a) a caracterização de uma coleção de fungos do género *Epicoccum*, obtida a partir do lenho da videira e (b) a avaliação preliminar dos efeitos produzidos por isolados do complexo *E. nigrum* em fungos associados a

doenças do lenho da videira, com ênfase para os envolvidos no complexo da “esca”.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização de endófitos da videira do género Epicoccum

Estudaram-se 16 isolados do género *Epicoccum*, obtidos a partir do lenho da videira, cujos dados de passaporte se encontram descritos no Quadro 1.

Os isolados mantidos em micoteca, no Laboratório de Patologia Vegetal (DCEB/ISA), em tubos contendo PDA (Gelose de Batata Dextrosada, BD-Difco, E.U.A.), à temperatura de 4 °C, na obscuridade, foram transferidos para placas de Petri de poliestireno (90 mm de diâmetro) contendo meio de PDA e incubados a 25 °C na obscuridade, durante 10 dias. Findo esse período, e porque a maioria das culturas não esporulou, procedeu-se à purificação das culturas pelo método de hifa única, com recurso a uma lupa binocular, para meio de PDA.

As características culturais dos isolados de *Epicoccum* (aspeto cultural, densidade, frente de crescimento, transparência, zonagem, pigmentos) foram avaliadas nos seguintes meios de cultura sólidos: PDA, gelose de extrato de malte (Malt Extract Agar – MEA, BD-Difco, Detroit, E.U.A.),

Quadro 1 - Isolados de *Epicoccum* sp. em estudo isolados de videira: data de obtenção, casta, local de colheita e coletor

Isolado	Data	Casta de Videira	Localidade	Coletor
Epic 1	2010	desconhecida	Torres Vedras	T. Nascimento
Epic 2	2012	Touriga Nacional	Lisboa (ISA)	T. Santos Coletto
Epic 3	2013	Antão Vaz	Montemor-o-Novo	P. Reis
Epic 4	2013	Casta Tinta	Tavira	T. Nascimento
Epic 5	2013	Boal Espanha	Tavira	T. Nascimento
Epic 6	2013	Deliciosa	Tavira	T. Nascimento
Epic 7	2013	Gouveio	Tavira	T. Nascimento
Epic 8	2013	Boal Branco	Tavira	T. Nascimento
Epic 9	2013	Sauvignan Blanc	Tavira	T. Nascimento
Epic 10	2013	Mourisco Preto do Algarve	Tavira	T. Nascimento
Epic 11	2013	Camarate	Tavira	T. Nascimento
Epic 12	2013	Formosa	Tavira	T. Nascimento
Epic 13	2013	Almenhaca	Tavira	T. Nascimento
Epic 14	2013	Boal Preto	Tavira	T. Nascimento
Epic 15	2013	Montepila	Tavira	T. Nascimento
Epic 16	2013	Carignan	Tavira	T. Nascimento

gelose de Czapeck-Dox (BD-Difco, E.U.A.) e gelose de aveia (Oatmeal Agar – OA, BD-Difco, E.U.A.), após um período de incubação a 28 °C, na obscuridade, durante 20 dias (Fávaro *et al.*, 2011). A coloração das colônias (frente e verso) foi determinada por comparação com as constantes da carta de cores de Rayner (1970). O crescimento micelial de cada um dos isolados foi avaliado ao fim de 12 dias de incubação, antes das culturas atingirem o bordo das placas. Para o efeito, foi efetuada a medição do diâmetro de cada uma das colônias, segundo dois eixos ortogonais, e calculada a média aritmética dos valores obtidos para cada isolado e repetição (três por isolado). Os resultados do crescimento micelial foram analisados estatisticamente, através da Análise de Variância (ANOVA) a um fator (isolado) e as médias comparadas com recurso ao teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) no programa Statistica 7.0 (StatSoft).

Para a identificação molecular dos isolados em estudo, incluíram-se três isolados de referência pertencentes à coleção do CBS-KNAW, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Holanda: CBS 173.38, *Epicoccum nigrum*, ex-type strain of *Epicoccum mezzetti* Goid.; CBS 173.73, *Epicoccum nigrum*, ex-type strain of *Phoma epicoccina* Punith., M.C. Tulloch & C.M. Leach e CBS 246.60, *Epicoccum pimprinum*, ex-type of *Phoma pimprina* P. N. Mathur, S. K. Menon & Thirum.

O DNA fúngico foi extraído utilizando o protocolo descrito por Cenis (1992), com adaptações de Nascimento *et al.* (2001). A análise do DNA foi determinada com base na sequenciação de parte do gene da β -tubulina (TUB2). Foram utilizados os “primers” T1 e T2 de O'Donnell e Cigelnik (1997). As reações de PCR foram preparadas com um volume final de 30 μ L, utilizando 32 μ M de cada dNTP, 0,16 μ M de cada “primer”, 1,0 U de Taq DNA polimerase (Dream Taq, Thermo Fisher Scientific, Lituânia) e 3 μ L de DNA previamente diluído à concentração de 10 ng/ μ L. A reação PCR decorreu num termociclador S1000 (Bio-Rad, E.U.A.) com o seguinte programa: pré-desnaturação a 94 °C, durante 5 min, seguida de 40 ciclos de 30 s a 94 °C (desnaturação), 30 s a 58 °C (emparelhamento), 1 min. e 30 s a 72 °C (extensão), terminando com um período de extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose

(Invitrogen, E.U.A.) e sequenciados pela StabVida (Portugal). As sequências foram assembladas e editadas para resolver ambiguidades utilizando o módulo SeqMan 5.05 do programa DNASTAR (Lasergene, E.U.A.). As sequências dos isolados em estudo, juntamente com outras sequências TUB2 de *Epicoccum* spp. obtidas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), foram alinhadas utilizando o MUSCLE no programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) e o alinhamento final foi posteriormente ajustado manualmente.

A análise filogenética foi implementada no MEGA 6.06, utilizando a máxima parcimónia com o algoritmo “subtree-pruning-regrafting”, os “gaps” e os dados em falta foram tratados como “complete deletions”. A robustez da topologia foi avaliada por 1000 replicações de bootstrap (Felsenstein, 1985). Foram também calculadas as medidas da máxima parcimónia tais como o comprimento da árvore (TL), o índice de consistência (CI), o índice de retenção (RI) e o índice de consistência reescalado (RC). A espécie *Epicoccum sorghinum* (CBS 179.80 e CBS 627.68) foi utilizada para “enraizar” a árvore obtida.

Interação entre *Epicoccum nigrum* e fungos do lenho da videira

Estudaram-se no total quatro fungos do lenho da videira, “*Botryosphaeria*” sp., *Pm. minimum* e *F. mediterranea* (isolados obtidos em Portugal) e *Pa. chlamydospora* (CBS 161.90). Os fungos encontravam-se conservados em micoteca, tal como descrito anteriormente para *Epicoccum*.

Nos estudos de interação pelo método de cultura pareada, testaram-se os 16 isolados do género *Epicoccum*, em relação a um isolado de “*Botryosphaeria*” sp. (Quadro 1). Retiraram-se discos miceliais (4 mm de diâmetro) de cada um dos fungos a confrontar, que se transferiram para placas de Petri contendo 15 mL de PDA, posicionando-os em locais opostos, afastados entre si cerca de 40 mm e 25 mm do bordo da placa (culturas pareadas). As placas foram incubadas a 25 °C sob obscuridade durante três dias, e para cada combinação “*Botryosphaeria*” sp. x *Epicoccum* spp. foram realizadas duas repetições. O crescimento micelial foi avaliado pela medição de dois raios de cada

uma das colónias, um em direção à extremidade da placa (r1) e outro em direção ao fungo em confronto (r2). A inibição do crescimento micelial, expressa em percentagem, foi calculada através da fórmula de Fokkema: $I (\%) = (r1-r2)/r1 \times 100$ (Fokkema, 1973). Os resultados foram analisados estatisticamente (programa Statistica 7.0, StatSoft), através da ANOVA a um fator para um nível de significância de 0,05, uma vez que não se observaram violações ao pressuposto do modelo linear (*dados não mostrados*). A comparação das médias do crescimento micelial foi realizada com recurso ao teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

No estudo da interação *Epicoccum* x fungos do complexo da esca (*Pa. chlamydospora*, *Pm. minimum* e *F. mediterranea*), selecionou-se apenas um dos isolados do género *Epicoccum* (Epic 2), que se enquadrou no grupo que proporcionou maior poder de inibição sobre "*Botryosphaeria*" sp.

A preparação das culturas pareadas *Epicoccum* x fungo do complexo da esca, o método de inoculação e as condições de incubação foram em tudo iguais às descritas para a interação *Epicoccum* spp. x *Botryosphaeria* sp.; exceto a duração do período de incubação, que se prolongou por 14 dias. Realizaram-se cinco repetições de cada uma das combinações (Epic 2 x fungo do complexo da esca) e os resultados foram avaliados e analisados estatisticamente aos 7 e 14 dias de crescimento, tal como descrito anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização de endófitos da videira do género *Epicoccum*

A análise das características culturais da coleção de fungos do género *Epicoccum* indica a impossibilidade de agrupar as diferentes culturas em morfotipos, com exceção para os isolados Epic 7 e Epic 8, que apresentaram as mesmas características culturais nos meios de PDA e Czapeck-Dox, podendo dessa forma ser inseridos num mesmo grupo.

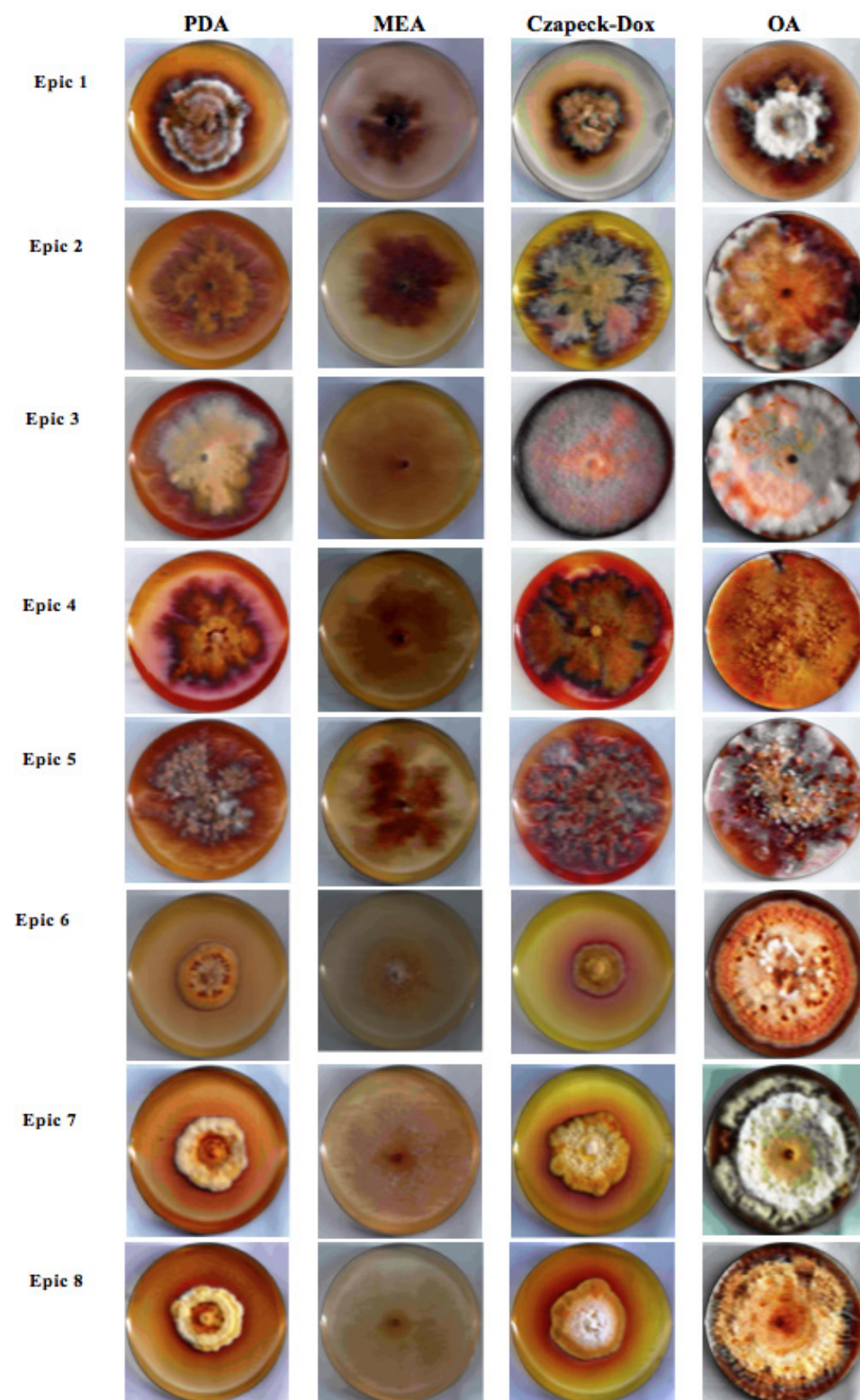
Em PDA, com exceção de Epic 3, Epic 5, Epic 13, Epic 15-16, os demais isolados revelaram aspeto cultural compatível com a espécie *Epicoccum nigrum*, usualmente caracterizada por coloração

próxima do "orange" (frente da colónia) e variando o reverso de "orange" a "dark red", além da frente de crescimento irregular e da presença de pigmento difundível no meio de cultura (Bonnell e Levetin, 1981; Fávaro *et al.*, 2011) (Figura 1). Ainda assim, a ausência de esporulação nas culturas estudadas dificultou a identificação da espécie, com base nas características morfológicas. A variabilidade de *E. nigrum* no que respeita à capacidade de esporulação é conhecida, e está dependente dos nutrientes disponíveis no meio de cultura (Bonnell e Levetin, 1981), do fotoperíodo e de características intrínsecas ao isolado, havendo alguns que são absolutamente dependentes de um período de exposição à luz para iniciarem a esporulação, em particular em meio de PDA (Bonnell e Levetin, 1982). Estes aspetos deverão ser tomados em consideração em trabalhos futuros.

O aspeto cultural dos isolados apresentou-se visivelmente alterado em MEA, variando a densidade da colónia de média a fraca e a coloração entre "buff" a "cinnamon", distinguindo-se os isolados Epic 9 ("chestnut"), Epic 10 ("orange") e Epic 15 ("orange" a "cinnamon") (Figura 1). O meio MEA revelou-se o menos diferenciador das características culturais de *Epicoccum*, comparativamente aos restantes.

Em meio Czapeck-Dox, a coloração dos isolados foi muito variável, entre "buff", "isabelline", "orange", "sepia", "olivaceous" a "brick"; a frente de crescimento apresentou-se maioritariamente irregular, com exceção para Epic 3, Epic 6-8, Epic 15-16, e não foi observada zonagem nas culturas. Pela variabilidade observada, este meio não permitiu agrupar isolados, ao contrário do referido por Fávaro *et al.* (2011) para o meio Czapeck-Dox (Figura 1). Ainda assim, a composição dos dois meios de cultura não é exatamente coincidente.

Todos os isolados apresentaram em meio OA uma densidade da colónia maioritariamente forte, ou média/forte, com exceção do isolado Epic 14; a frente de crescimento foi maioritariamente regular, zonagem ausente, exceto em Epic 6 e Epic 9 e a coloração das culturas foi muito variável (Figura 1). Pela variabilidade observada, o meio OA também não se revelou muito adequado para identificar grupos na espécie ou complexo *E. nigrum*.



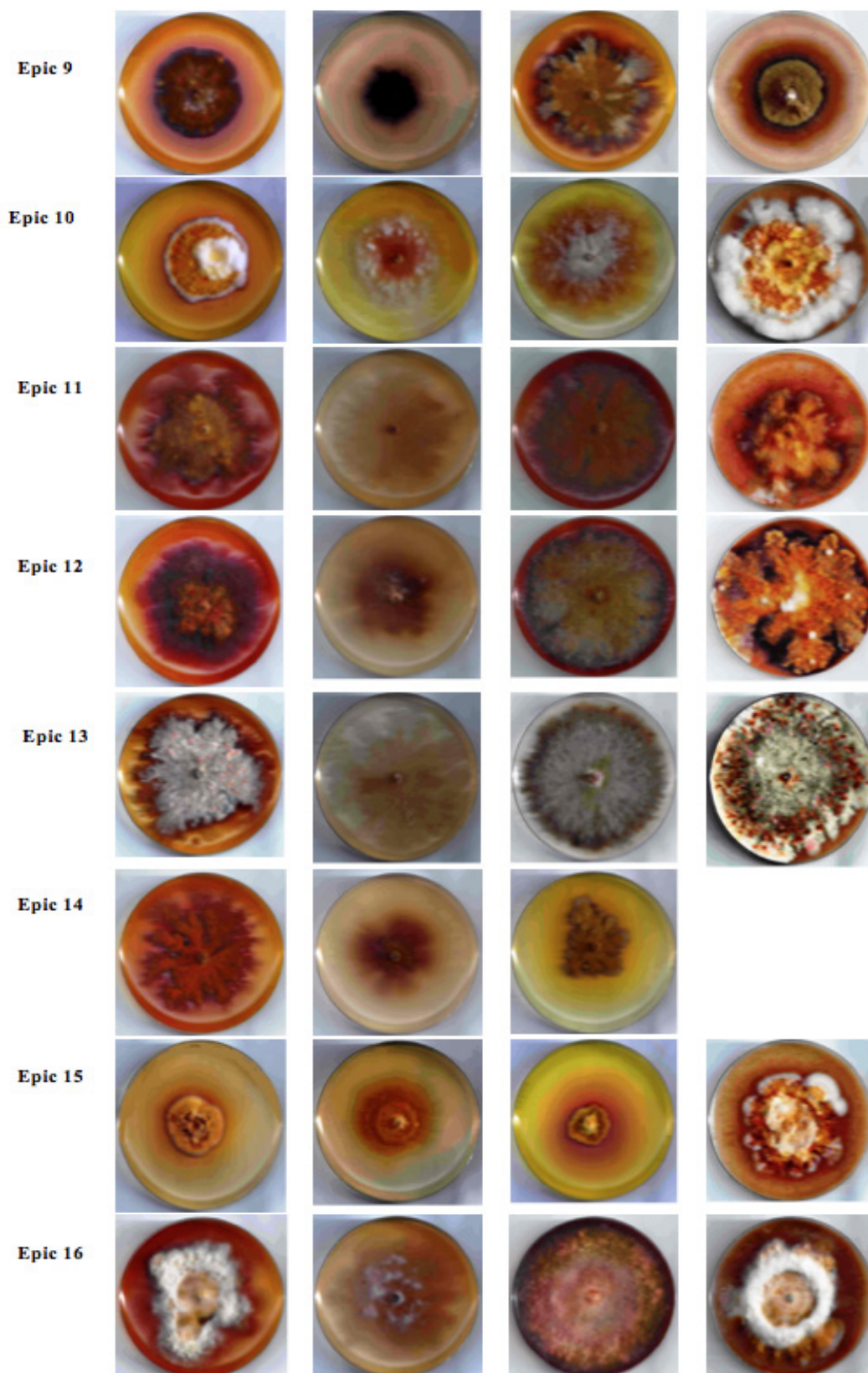


Figura 1 - Culturas de *Epicoccum* spp. (Epic), em meio de PDA, MEA, Czapecck-Dox e OA; ao fim de 20 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 28 °C. Devido a contaminação, a cultura Epic 14 em OA não consta na figura acima.

Para efeitos da caracterização da coleção em estudo, com base no crescimento micelial dos 16 isolados do género *Epicoccum* em diferentes meios de cultura (PDA, MEA, Czapeck-Dox e OA) e à temperatura de 28 °C, a ANOVA dos resultados revelou diferenças significativas entre isolados ($P \leq 0,05$), para cada um dos meios de cultura. A comparação das médias do crescimento micelial evidenciou um grupo de isolados com menor crescimento, a diferir significativamente de outro grupo com maior crescimento (Figura 2).

Em meio de PDA, o diâmetro das colónias de *Epicoccum* variou entre 18 e 73 mm. O meio de PDA foi um dos que permitiu melhor agrupamento dos isolados, com Epic 13 a apresentar maior crescimento micelial, ainda assim a não diferir significativamente de Epic 3 e Epic 5. No meio MEA, o diâmetro das colónias variou entre 25

e 77 mm. O isolado Epic 3 foi o que apresentou maior crescimento micelial, não diferindo significativamente de Epic 13 e Epic 16. Em OA o crescimento micelial variou entre 39 e 77 mm, sendo que Epic 3-4 e Epic 9 demonstraram as médias de crescimento mais elevadas, ainda assim não diferindo significativamente das apresentadas pelos isolados Epic 2, Epic 5 e Epic 11. No meio Czapeck-Dox, o crescimento dos isolados variou entre 15 e 80 mm, com os isolados Epic 2-3, Epic 5, Epic 9, Epic 11, Epic 13 e Epic 16 a apresentarem as médias mais elevadas, não diferindo significativamente entre si, nem de Epic 4.

Em resumo, no meio de PDA destacaram-se sete isolados com crescimento reduzido (Epic 1, 6-8, 10, 12 e 15). Em meio de MEA surgiram seis isolados com idêntico comportamento (Epic 1, 6, 7, 10, 14 e 15) e em meio de OA destacaram-se

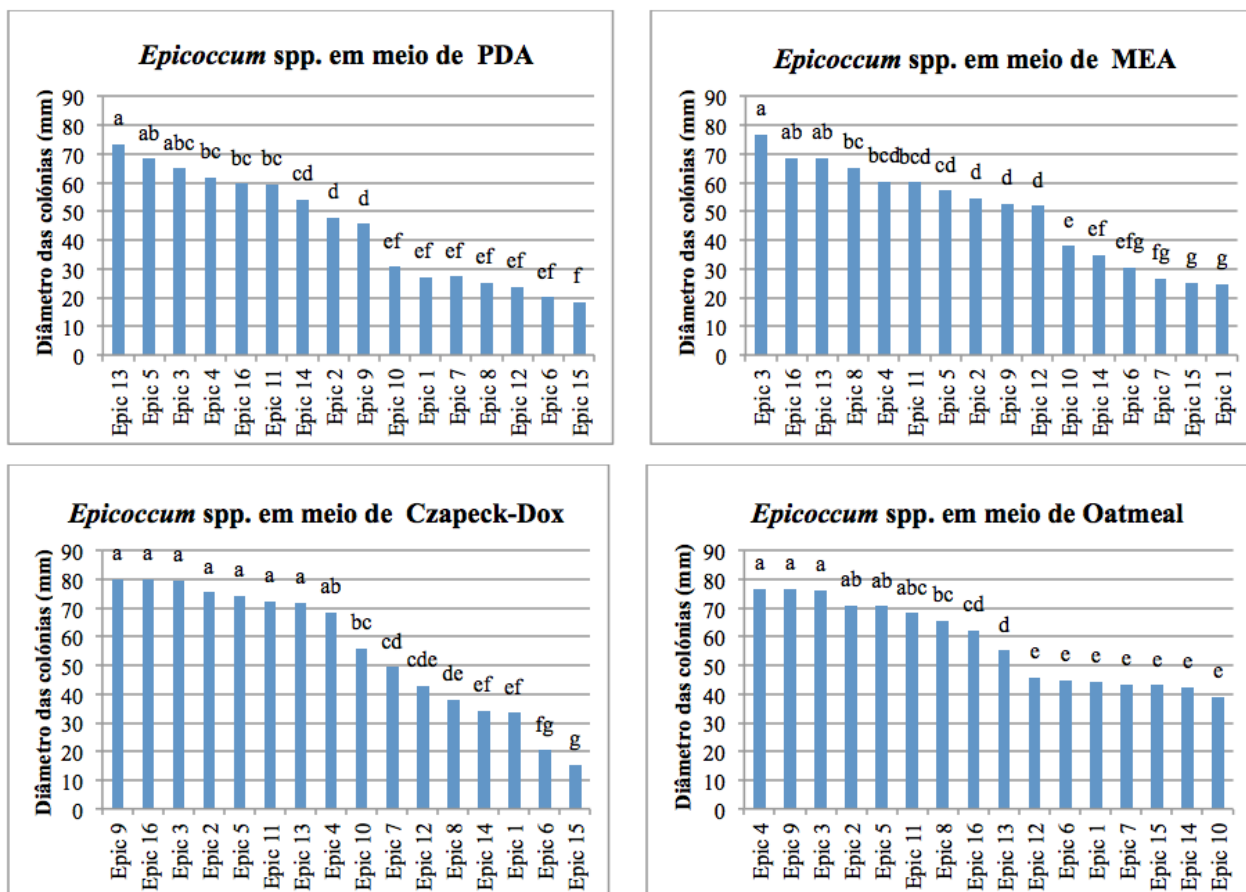


Figura 2 - Crescimento micelial de 16 isolados de *Epicoccum* spp., obtidos de videira, em diferentes meios de cultura, após 12 dias de incubação na obscuridade, à temperatura de 28 °C. Para cada meio de cultura, colunas seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).

novamente sete isolados com crescimento reduzido (Epic 1, 6, 7, 10, 12, 14 e 15), que coincide com o grupo anterior mais o isolado Epic 12, também discriminado em meio de PDA. No que se refere ao meio Czapeck-Dox, destacaram-se sobretudo os isolados com maior crescimento micelial (Epic 2, 3, 5, 9, 11, 13 e 16), a não diferirem significativamente de Epic 4.

A espécie *E. nigrum* é conhecida por apresentar elevada variabilidade morfológica e cultural (Schol-Schwarz, 1959; Kilpatrick e Chilvers, 1981; Arenal *et al.*, 2002). Tais características podem variar com fatores ambientais e condições de cultura, como a temperatura e a composição do meio em nutrientes (Bonnell e Levetin, 1981). No entanto, estas diferentes características dos isolados têm sido confundidas com variação intraespecífica (Fávaro *et al.*, 2011), o que pode ter levado a erros na identificação de isolados da espécie *E. nigrum*, caso esta englobe diferentes espécies crípticas.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram essa variabilidade, nomeadamente entre os isolados de *Epicoccum* (*E. nigrum*) provenientes de um mesmo hospedeiro (*V. vinifera*) e de uma mesma região geográfica (Tavira, Portugal), como é o caso dos isolados Epic 4 a 16. Ainda assim, para inferir se essa variabilidade é de natureza intraespecífica, equivalendo à presença de diferentes genótipos na mesma espécie, ou se é de natureza interespecífica, correspondendo a diferentes espécies em *E. nigrum*, é essencial o uso de uma abordagem polifásica, com recurso a diferentes marcadores, desde morfo culturais, fisiológicos aos moleculares (Fávaro *et al.*, 2011).

A caracterização molecular dos isolados de *Epicoccum* spp. foi levada a efeito usando sequências de parte do gene da β -tubulina (TUB2), por se ter revelado em trabalhos anteriores tão discriminante quanto a região ITS1-5.8S-ITS2 (Fávaro *et al.*, 2011). A análise filogenética das sequências TUB2 dos isolados de *Epicoccum* em estudo, juntamente com sequências do mesmo gene de *Epicoccum* spp. obtidas do GenBank, permitiu agrupar os isolados em quatro grupos dentro do complexo *E. nigrum*, o que sugere estarmos perante um complexo de espécies (Figura 3).

O isolado Epic 1 agrupa com o isolado de referência CBS 173.38, que é o isolado-tipo de *E. mezzettii*, atualmente considerado sinónimo de *E. nigrum*. Os isolados Epic 6-9 encontram-se numa posição basal ao grupo que contém o isolado de referência CBS 173.73 para *Phoma epicoccina*, atualmente designado *E. nigrum*. Os isolados Epic 2-4, Epic 10-14 e Epic 16 encontram-se agrupados no mesmo grupo com um valor de bootstrap de 78%, sendo que o isolado Epic 10 é distinto dos restantes desse grupo. O isolado Epic 15 é filogeneticamente próximo dos isolados CE 7; CE 12, CE 24 e CE27 obtidos do GenBank. O grupo formado por estes isolados apresenta um valor de bootstrap de apenas 30%. Nenhum dos isolados em estudo agrupou com as espécies *Epicoccum pimprinum* (sin. *Phoma pimprina*) ou *Epicoccum sorghi* (sin. *Phyllosticta sorghina*), as quais, em conjunto com *E. nigrum*, formam o grupo M-*Epicoccum* na família Didymellaceae (Aveskamp *et al.*, 2010). A análise de parcimónia de 286 caracteres resultou em duas árvores mais parcimoniosas (TL = 55 passos; CI = 0,673469; RI = 0,926606; e RC = 0,657048), a primeira das quais é apresentada na Figura 3.

A caracterização molecular da coleção de *E. nigrum* obtida de videira, ainda que baseada apenas na sequenciação do gene TUB2, aponta como hipótese mais plausível que *E. nigrum* seja um complexo de espécies, conforme explicado anteriormente. Também o estudo realizado por Fávaro *et al.* (2011), com isolados de cana-de-açúcar, revelou a presença inequívoca de dois grupos de isolados que, apesar de identificados como *E. nigrum* no GenBank, corresponderão a duas espécies distintas, a necessitar de resolução/identificação. Para que esta possa ser levada a efeito, serão necessários estudos mais aprofundados, com recurso a uma análise multigénica.

A correta identificação de espécies no complexo *E. nigrum* é muito importante, não por simples curiosidade sistemática mas porque, englobando distintos isolados com potencial para controlo biológico contra diversas doenças e em diversas culturas (Elmer *et al.*, 2001; Elmer e Reglinski, 2006), é essencial conhecer-se que linhagem, espécie ou espécies apresentam esse potencial (Fávaro *et al.*, 2011).

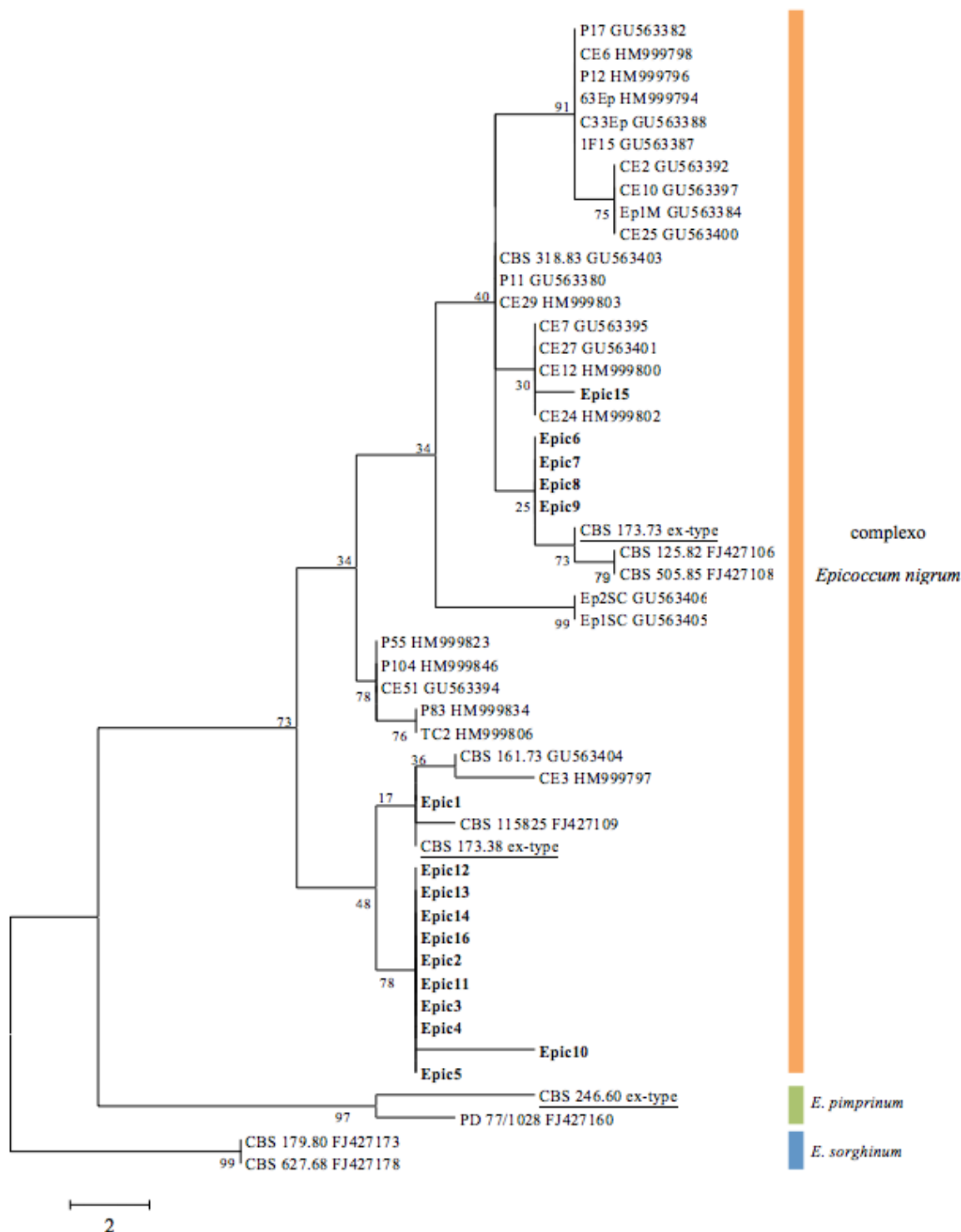


Figura 3 - Uma de duas mais parcimoniosas árvores obtidas do alinhamento das sequências de β -tubulina 2 dos 16 isolados em estudo, bem como das sequências *Epicoccum* spp. obtidas do GenBank. A árvore foi enraizada utilizando dois isolados de *Epicoccum sorghinum*. Os valores de suporte de “bootstrap” estão indicados junto de cada nó. Os isolados de *Epicoccum* em estudo estão representados a negrito, e os isolados tipo (“ex-type strains”) estão sublinhados. A escala representa 2 alterações.

Interação entre *Epicoccum nigrum* e fungos do lenho da videira

Os fungos Botryosphaeriaceae são importantes agentes patogénicos da videira e, comparativamente a outros fungos do lenho, têm crescimento micelial muito rápido. Em regra, sobrepõem-se aos restantes fungos do lenho da videira. Neste trabalho admitiu-se que, idealmente, o isolado do género *Epicoccum* a selecionar, contra os fungos envolvidos no complexo da esca, deveria ter igualmente algum poder de inibição sobre fungos Botryosphaeriaceae. Para o efeito, antes de selecionar o isolado de *Epicoccum* a testar contra os restantes fungos do lenho, testou-se toda a coleção relativamente a um isolado de "*Botryosphaeria*" sp.

Os resultados apurados permitiram confirmar a existência de diferenças significativas entre isolados de *Epicoccum*, relativamente a "*Botryosphaeria*" sp. ($P \leq 0,05$), com evidência de um efeito inibidor mais acentuado, ainda que modesto, para os isolados Epic 2, Epic 3 e Epic 13, que não diferiram significativamente entre si, nem da maioria dos restantes isolados (Figura 4).

É de notar que sobretudo Epic 6 revelou tendência para favorecer o crescimento micelial de "*Botryosphaeria*" sp. O crescimento muito rápido deste fungo, associado ao facto de formar abundante micélio aéreo, dificultou as leituras deste ensaio, aumentando a probabilidade de erro, pelo que as

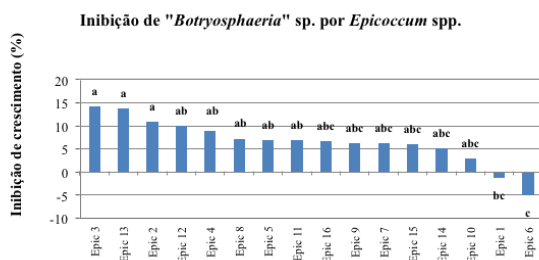


Figura 4 - Efeito de fungos do género *Epicoccum* (Epic 1-16) na inibição do crescimento micelial de "*Botryosphaeria*" sp., após incubação durante 72 h na obscuridade, à temperatura de 25 °C, em meio de cultura PDA (colunas seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si para $\alpha = 0,05$, teste de Tukey).

variâncias associadas às médias foram elevadas. Assim se explica que os isolados de *Epicoccum* com comportamento intermédio não tenham diferido significativamente nem dos melhores nem dos piores.

Face aos resultados obtidos, selecionou-se o isolado Epic 2, obtido de "Touriga Nacional" (Quadro 1), para prosseguimento dos ensaios de antagonismo.

Os resultados do estudo de interação *Epicoccum* (isolado Epic 2) versus os principais fungos envolvidos no complexo da esca da videira, *Pa. chlamydospora*, *Pm. minimum* e *F. mediterranea*, foram registados ao fim de 7 e 14 dias de incubação. Inicialmente (7 dias), *Epicoccum* inibiu significativamente o crescimento micelial de *F. mediterranea* (Figura 5), mas essa inibição não foi significativamente diferente da produzida sobre *Pa. chlamydospora* que, por sua vez, não diferiu da observada relativamente a *Pm. minimum*. Posteriormente (14 dias), os efeitos foram mais evidentes, sendo todos os fungos inibidos por *Epicoccum*, ainda assim, com um efeito menos significativo sobre *Pm. minimum* (Figura 5).

A inibição de *Pa. chlamydospora* por Epic 2 pode ser devida à produção de metabolitos secundários produzidos por Epic 2 (antibiose), sendo este um dos mecanismos de antagonismo descritos em interações fúngicas envolvendo *Epicoccum*, ou seja, o antagonista não é afetado, mas origina redução de crescimento (ou morte) da espécie antagonizada.

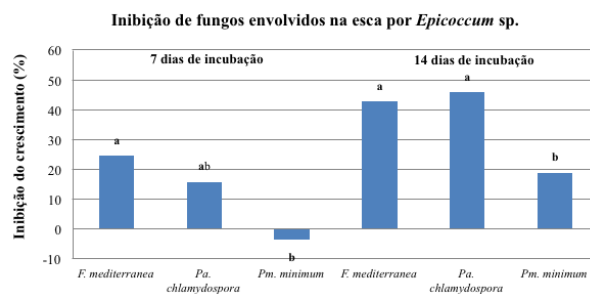


Figura 5 - Inibição do crescimento micelial de *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium minimum*, em cultura pareada. Cada um dos fungos foi confrontado com Epic 2. As culturas cresceram durante 7 e 14 dias em meio de cultura PDA, na obscuridade à temperatura de 25 °C. Letras diferentes a afetar cada uma das colunas representam diferenças significativas para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).

Os efeitos de *Epicoccum* sobre *Pa. chlamydospora* parecem mesmo ter afetado a cultura para além da zona de proximidade *Epicoccum*/*Pa. chlamydospora* (r1), uma vez que se observou um halo de inibição em torno deste último fungo. Para confirmar esta hipótese, foi realizada uma ANOVA, comparando o crescimento de *Pa. chlamydospora*, ao fim de 14 dias de incubação, quando confrontado com ele mesmo (controlo) e com *Epicoccum*, o que permitiu verificar que o valor médio de r1, ainda que ligeiramente, diferiu significativamente numa e noutra condição de ensaio ($F=7,2$; $P=0,02778$), o que comprova que o efeito de inibição se estendeu a toda a colónia (Figura 6).

A inibição de *F. mediterranea* por *Epicoccum* aparenta tratar-se, sobretudo, de um mecanismo de competição pelo espaço e nutrientes, onde Epic 2 parece travar o crescimento de *F. mediterranea* (Figura 6). Ainda assim, a margem da colónia de cada um dos fungos não se confronta em toda a sua extensão, havendo a possibilidade de *Epicoccum* estar a exercer alguma ação de antagonismo sobre o fungo patogénico. De salientar que não se verificaram diferenças significativas de crescimento entre os valores de r1 de *Fomitiporia* x *Fomitiporia* (controlo) e os de *Fomitiporia* x *Epicoccum* ($F=0,167$; $P=0,6938$).

Os efeitos de Epic 2 sobre *Pm. minimum* são mais complexos. Aparentemente, no início do ensaio (7 dias) o antagonista pareceu favorecer o crescimento de *Pm. minimum*, o que não foi comprovado estatisticamente, pois esse ligeiro favorecimento não diferiu significativamente da inibição produzida sobre *Pa. chlamydospora*, ao fim de igual período de incubação, tal como foi evidenciado na Figura 5. A circunstância de ambos os fungos patogénicos terem crescimento muito lento explica a dificuldade na determinação do crescimento exato de cada um dos fungos, para um período de incubação tão curto. Decorridos 14 dias de incubação, verificou-se que Epic 2 inibia efetivamente *Pm. minimum*, tanto mais que o valor de r1, nestas condições, não diferiu significativamente do valor de r1, quando *Pm. minimum* foi confrontado com ele próprio ($F=1,00$; $P=0,3466$). Por conseguinte, a inibição de *Pm. minimum*, parece ter resultado de uma conjugação de mecanismos de competição e antibiose (Figura 6).

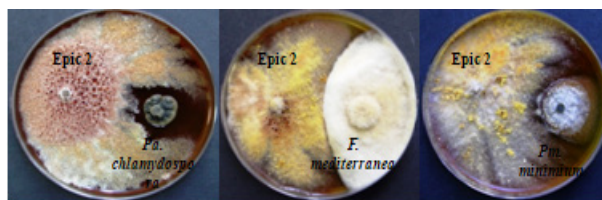


Figura 6 - Inibição do crescimento micelial de *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea* e *Phaeoacremonium minimum*, em cultura pareada com *Epicoccum* sp. (Epic 2), ao fim de 14 dias de incubação em meio de cultura PDA, na obscuridade à temperatura de 25 °C.

Inúmeros compostos produzidos por *E. nigrum* encontram-se descritos na literatura como possuindo ação antimicrobiana. Dentre os melhor caracterizados, salientam-se a flavipina e as epicorazina A e B, que têm revelado efeitos positivos no controlo biológico de *Monilinia* spp. e de diversos oomicetas, designadamente pertencentes aos géneros *Pythium* e *Phytophthora*. Por sua vez, a flavipina, para além da ação anti-fúngica, tem demonstrado igualmente ação antagonista contra inúmeras bactérias fitopatogénicas (Madrigal *et al.*, 1991; Fávaro *et al.*, 2012), revelando um amplo espectro de ação e o potencial interesse para o controlo biológico de uma vasta gama de organismos fitopatogénicos.

Para além do mecanismo de antibiose, a competição entre *Epicoccum* e fungos patogénicos é igualmente relatada na literatura, entre outros, como no caso de *Botrytis cinerea* em feijoeiro (Hannusch e Boland, 1996) ou *Fusarium graminearum* em grãos de trigo e *in vitro* (Jensen *et al.*, 2016).

Em videira, é conhecida a ação antagonista de fungos do género *Epicoccum* em relação a *Plasmopara viticola* (Kortekamp, 1997) e a *B. cinerea* (Elmer e Reglinski, 2006). Também se sabe que fungos do género *Epicoccum* são frequentemente isolados do lenho da videira, admitindo-se que possam atuar como agentes de controlo biológico (Pancher *et al.*, 2012; Bruez *et al.*, 2014). Ainda assim, desconhece-se com exatidão o mecanismo de ação e o seu papel na comunidade fúngica que com eles habitam.

Também se encontra relatado o possível efeito de *E. nigrum* (a par de *Aureobasidium pullulans*) na recuperação natural de castas de videira afetadas pelo fitoplasma causador da Flavescência Dourada (Martini *et al.*, 2009).

Relativamente aos fungos do lenho da videira, apesar de espécies do género *Epicoccum* (maioritariamente referidas como *E. nigrum*) serem frequentemente isoladas quer de videiras doentes quer de videiras sãs (Pancher *et al.*, 2012; Bruez *et al.*, 2014), não existem estudos sobre as relações que se estabelecem entre estes endófitos e os agentes causais das doenças do lenho. No decurso do presente estudo foi igualmente isolado *Epicoccum* do lenho da videira, sendo Epic 2 um exemplo de isolado obtido de varas de videira aparentemente sãs.

A crescente restrição legal à utilização da luta química no controlo dos inimigos das culturas, por motivos de toxicidade para o homem, animais e para o ambiente, justifica que se desenvolvam alternativas viáveis aos produtos químicos de síntese, baseadas em práticas culturais adequadas, mas também recorrendo a organismos de controlo biológico ou a produtos resultantes do seu metabolismo secundário. Face aos resultados apurados

no presente estudo, os fungos do género *Epicoccum* surgem como promissores agentes de controlo biológico e a merecer estudos mais aprofundados, designadamente a validação *in planta*.

CONCLUSÕES

Os isolados estudados, pertencentes ao género *Epicoccum*, revelaram elevada variabilidade fenotípica e molecular, indicando que, muito provavelmente, *E. nigrum* encerra um complexo de espécies.

Alguns dos isolados de *Epicoccum*, em particular Epic 2, 3 e 13 foram capazes de inibir o crescimento micelial de um fungo Botryosphaeriaceae, associado ao *dieback* da videira. O isolado selecionado no prosseguimento dos estudos (Epic 2) inibiu significativamente o crescimento micelial de *Pa. chlamydospora*, *F. mediterranea* e, em menor extensão o de *Pm. minimum*, principais fungos envolvidos no complexo da “esca” da videira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aly, A.H.; Debbab, A. & Proksch, P. (2011) – Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 90, n. 6, p. 1829-1845. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3270-y>
- Ammad, F.; Benchabane, M. & Toumi, M. (2014) – Diversity of fungal trunk pathogens associated with grapevine dieback of grapevine in Algeria. *Jordan Journal of Biological Sciences*, vol. 7, n. 1, p. 35-39. <https://doi.org/10.12816/0008211>
- Amrani, M.E.; Lai, D.; Debbab, A.; Aly, A.H.; Siems, K.; Seidel, C.; Schnekenburger, M.; Gaigneraux, A.; Deiderich, M.; Feger, D.; Wenhan, L. & Proksch, P. (2014) – Protein kinase and HDAC inhibitors from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of Natural Products*, vol. 77, n. 1, p. 49-56. <https://doi.org/10.1021/np4005745>
- Arenal, F.; Platas, G.; Martin, J.; Asensio, F.J.; Salazar, O.; Collado, J.; Vicente, F.; Babilio, A.; Ruibal, C.; Royo, I.; De Pedro, N. & Peláez, F. (2002) – Comparison of genotypic and phenotypic techniques for assessing the variability of the fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 93, n. 1, p. 36-45. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01654.x>
- Arnold, A.E. (2005). Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. In: Deshmukh, D. (Ed.) – *Current Trends in Mycological Research*; New Delhi, India: Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., p. 49-68.
- Aveskamp, M.M.; de Gruyter, J.; Woudenberg, J.H.C.; Verkley, G.J.M. & Crous, P.W. (2010) – Highlights of the *Didymellaceae*: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, vol. 65, p. 1-60. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.65.01>
- Block, K.L.; Rolshausen, P.E. & Cantu, D. (2013) – In search of solutions to grapevine trunk diseases through “crowd-sourced” science. *Frontiers in Plant Science*, vol. 4, art. 394. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00394>
- Bonnell, B.S. & Levetin, E. (1981) – The influence of nutrition on the growth and sporulation of two strains of *Epicoccum nigrum*. *Mycologia*, vol. 73, n. 2, p. 238-243. <https://doi.org/10.2307/3759644>

- Bonnell, B.S. & Levetin, E. (1982) – Effect of light on the sporulation of two strains of *Epicoccum nigrum*. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, vol. 62, p. 89-90.
- Bruez, E.; Vallance, J.; Gerbore, J.; Lecomte, P.; Da Costa, J.-P.; Guerin-Dubrana, L. & Rey, P. (2014) – Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of Esca leaf symptomatic and asymptomatic vines. *PLoS ONE*, vol. 9, n. 5, art. e95928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095928>
- Carlucci, A.; Cibelli, F.; Lops, F.; & Raimondo, M. L. (2015) – Characterization of Botryosphaeriaceae species as causal agents of trunk diseases on grapevines. *Plant Disease*, vol. 99, n. 12, p. 1678-1688. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0286-RE>
- Casieri, L.; Hofstetter, V.; Viret, O. & Gindro, K. (2009) – Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 48, n. 1, p. 73-83. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-2876
- Cenis, J.L. (1992) – Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, vol. 20, n. 9, p. 2380. <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2380>
- Chandra, S. (2012) – Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 95, n. 1, p. 47-59. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4128-7>
- Edwards, J. & Pascoe, I.G. (2004) – Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology*, vol. 33, n. 2, p. 273-279. <https://doi.org/10.1071/AP04016>
- Elmer, P.A.G.; Alcock, E.A. & Perry, F. (2001) – *Epicoccum nigrum* as a biological control and as a source of antimicrobial metabolites. *Proceedings of the 13^o Biennial Conference of Australasian Plant Pathology Society*, Cairns, p. 339.
- Elmer, P.A.G. & Reglinski, T. (2006) – Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, vol. 55, n. 2, p. 155-177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01348.x>
- Fávaro, L.C.L.; de Melo, F.L.; Aguilar-Vildoso, C.I. & Araújo, W.L. (2011) – Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. *PLoS ONE*, vol. 6, n. 8, art. e14828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014828>
- Fávaro, L.C.L.; Sebastianes, F.L.S. & Araújo, W.L. (2012) – *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *PLoS ONE*, vol. 7, n. 6, art. e36826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036826>
- Felsenstein, J. (1985) – Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, vol. 39, n. 4, p. 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Fokkema, N.J. (1973) – The rôle of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. *Physiological Plant Pathology*, vol. 3, n. 2, p. 195-202. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(73\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0048-4059(73)90082-9)
- Graniti, A.; Surico, G. & Mugnai, L. (2000) – Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 39, n. 1, p. 16-20. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1539
- Halleen, F.; Crous, P.W. & Petrin, O. (2003) – Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology*, vol. 32, n. 1, p. 47-52. <https://doi.org/10.1071/AP02062>
- Hofstetter, V.; Bart, B.; Croll, D.; Viret, O.; Couloux, A. & Gindro, K. (2012) – What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity*, vol. 54, n. 1, p. 51-67. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0171-z>
- Hannusch, D.J. & Boland, G. J. (1996) – Interactions of air temperature, relative humidity and biological control agents on grey mold of bean. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 102, n. 2, p. 133-142. <https://doi.org/10.1007/BF01877100>
- Jensen, B.D.; Knorr, K. & Nicolaisen, M. (2016) – In vitro competition between *Fusarium graminearum* and *Epicoccum nigrum* on media and wheat grains. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 146, n. 3, p. 657-670. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0950-6>
- Kilpatrick, J.A. & Chilvers, G.A. (1981) – Variation in a natural population of *Epicoccum purpurascens*. *Transaction of the British Mycological Society*, vol. 77, n. 3, p. 497-508. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(81\)80097-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(81)80097-6)
- Kortekamp, A. (1997) – *Epicoccum nigrum* Link: A biological control agent of *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et De Toni? *Vitis* vol. 36, n. 4, p. 215-216.

- Kuntzmann, P.; Villaume, S.; Larignon, P. & Bertsch, C. (2010) – Esca, BDA and Eutypiosis: foliar symptoms, trunk lesions and fungi observed in diseased vinestocks in two vineyards in Alsace. *Vitis*, vol. 49, n. 2, p. 71-76.
- Kusari, S.; Hertweck, C. & Spiteller, M. (2012) – Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, vol. 19, n. 7, p. 792-798. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004>
- Larena, I.; Torres, R.; De Cal, A.; Liñán, M.; Melgarejo, P.; Domenichini, P.; Bellini, A.; Mandrin, J.F.; Lichou, J.; Ochoa de Eribe, X. & Usall, J. (2005) – Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biological Control*, vol. 32, n. 2, p. 305-310. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.10.010>
- Madrigal, C.; Tadeo, J.L. & Melgarejo, P. (1991) – Relationship between flavipin production by *Epicoccum nigrum* and antagonism against *Monilinia laxa*. *Mycological Research*, vol. 95, n. 12, p. 1375-1381. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80388-2](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80388-2)
- Martini, M.; Musetti, R.; Grisan, S.; Polizzotto, R.; Borselli, S.; Pavan, F. & Osler, R. (2009) – DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Disease*, vol. 93, n. 10, p. 993-998. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-0993>
- Mugnai, L.; Graniti, A. & Surico, G. (1999) – Esca (black measles) and brown wood streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*, vol. 83, n. 5, p. 404-418. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.5.404>
- Nascimento, T.; Rego, C. & Oliveira, H. (2001) – Detection of *Cylindrocarpum* black-foot pathogens in grapevine by nested PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 40, n. sup., p. S357-S361. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1616
- O'Donnell, K. & Cigelnik, E. (1997) – Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 7, n. 1, p. 103-116. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>
- Pancher, M.; Ceol, M.; Corneo, P.E.; Longa, C.M.O.; Yousaf, S.; Pertot, I. & Campisano, A. (2012) – Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, n. 12, p. 4308-4317. <https://doi.org/10.1128/AEM.07655-11>
- Porrás-Alfaro, A. & Bayman, P. (2011) – Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, vol. 49, p. 291-315. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081831>
- Rajesh, P.S. & Rai, V.R. (2013) – Hydrolytic enzymes and quorum sensing inhibitors from endophytic fungi of *Ventilago madraspatana* Gaertn. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 2, n. 2, p. 120-124. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.01.002>
- Rayner, R.W. (1970) – *A Mycological Colour Chart*. British Mycological Society and CAB International Mycological Institute, Kew, 34p.
- Schol-Schwarz, M.B. (1959) – The genus *Epicoccum* Link. *Transaction of the British Mycological Society*, vol. 42, n. 2, p. 149-173. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(59\)80024-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(59)80024-3)
- Schulz, B. & Boyle, C. (2006) – What are endophytes? In: Schulz, B.J.E.; Boyle, C.J.C. & Sieber, T.N. (Eds.) *-Microbial Root Endophytes*, Vol. 9 of the series Soil Biology, Springer Berlin Heidelberg, p. 1-13.
- Slippers, B. & Wingfield, M.J. (2007) – Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, vol. 21, n. 2-3, p. 90-106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. & Kumar, S. (2013) – MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 30, n. 12, p. 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>